

VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ENCAPSULADAS EM LEITE

SANDRA MILENA DIAZ PUENTES¹
MAGALI SOARES DOS SANTOS POZZA^{1*}
ROGÉRIO ALESON DIAS BEZERRA¹
SILVIO MAYKE LEITE¹
KEILA MILESKI PONTES¹
LUIS ALFONSO CASTRO ZAMBRANO¹
RAFAELA LEMES DA COSTA¹
UILQUER SILVA DOS SANTOS¹

A microbiota intestinal humana exerce um papel importante tanto na saúde quanto na doença e a suplementação da dieta com probióticos pode assegurar o equilíbrio dessa microbiota. Kefir é uma bebida fermentada de fácil preparo e economicamente acessível, originado da ação dos grãos de Kefir que são compostos de leveduras e bactérias benéficas e uma matriz de polissacarídeos. O objetivo do trabalho foi determinar a eficiência de três encapsulantes na proteção de dois produtos contendo bactérias: Kefir artesanal e probiótico comercial durante 21 dias de vida de prateleira. Os tratamentos foram o uso das seguintes soluções para encapsulamento por extrusão: T1: alginato a 1% na encapsulação de probiótico comercial (*Lactobacillus rhamnosus*); T2: alginato 1% + 0,5 % de amido de milho para encapsulação de probiótico comercial; T3: alginato 1% + 0,5% de goma acácia para encapsulação de probiótico comercial; T4: alginato a 1% para encapsulação de Kefir fermentado; T5: alginato a 1% + 0,5% de amido de milho para encapsulação de Kefir fermentado; T6: alginato 1% + 0,5% de goma acácia para encapsulação de Kefir fermentado. O tratamento contendo somente alginato e probiótico comercial obteve as menores contagens de lactobacilos ($6,99 \log_{10}$). Para acidez titulável não houve diferença significativa entre os tratamentos aos 21 dias de armazenamento (27,50º D). Com relação a composição do Kefir, destaca-se seu conteúdo de proteína e lipídeos. Todos os encapsulantes testados foram eficientes em manter viáveis as células microbianas para que possam atingir o intestino em quantidades satisfatórias.

PALAVRAS-CHAVE: KEFIR; MACROCÁPSULAS; PROBIÓTICOS; VIDA DE PRATELEIRA

¹ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, PPZ, Maringá, UEM.

* E-mail: msspozza@uem.br

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são microrganismos vivos que são benéficos aos hospedeiros. Possuem a capacidade de aderência limitando a adesão de bactérias patogênicas, podendo-se multiplicar e produzir diferentes substâncias que atuam como bactericidas, não são invasivos e sua presença pode abranger uma alta diversidade de espécies conhecida como microbiota intestinal (FULLER, 1989; HAVENAAR et al., 1992, SALMINEN et al., 1996; FARNWORTH, 2005).

Kefir é uma bebida fermentada que pode ser láctea ou com água. É feito a partir da inoculação de grãos de Kefir (que a sua vez estão compostos de leveduras e bactérias benéficas e uma matriz de polissacarídeos) em leite ou parte da bebida como cultura starter que resulta em uma bebida semelhante ao iogurte, porém com características próprias associadas, principalmente, à presença de CO₂ e etanol (OTLES et al., 2003; JAMBHULKAR, 2020).

No sistema digestório há uma diferença na distribuição dos microrganismos dada pela mudança das características ambientais próprias de cada órgão, como por exemplo a acidez do estômago (pH 1-3) e alteração do pH no intestino (6-7,5) (SENSOI, 2021). Portanto, é extremamente importante gerar uma proteção para as bactérias probióticas que permitam sua integridade até o órgão alvo, e por isso a encapsulação destas torna-se uma excelente alternativa (YADAV et al., 2013; KAVAS et al., 2022). Esta consiste em envolver a bactéria mediante uma camada protetora que permite a passagem dos probióticos pelo trato digestório sem sofrerem alteração nem estresse e chegando em uma dose adequada (DING e SHAH, 2009; FRITZEN-FREIRE et al., 2013). Por isso a seleção do material encapsulante é primordial; este deve ser comestível, com capacidade de emulsificar, manter a viabilidade das bactérias por um longo tempo, formação de filme, dentre outras (RAJAM e SUBRAMANIAN, 2022). As matérias primas utilizadas podem ser biopolímeros de plantas, extratos marinhos, proteínas, fibras ou polissacarídeos animais (RAJAM e SUBRAMANIAN, 2022).

Dentre as técnicas de encapsulação de probióticos, a extrusão é a mais popularmente empregada para a obtenção de micropartículas de alginato de cálcio (Pedroso, 2011). O método físico baseia-se na gelificação externa do alginato e consiste em incorporar o material a ser encapsulado em uma solução de alginato de sódio, para depois a mistura sofrer extrusão gota a gota, por meio de uma pipeta de calibre reduzido ou de uma seringa, para uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) (SMRDEL et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi determinar a eficiência de diferentes níveis de inclusão de três encapsulantes (goma de acácia, alginato e amido de milho) na proteção de dois probióticos: Kefir artesanal e probiótico comercial contendo *Lactobacillus rhamnosus* durante 21 dias de vida de prateleira.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizados ágar MRS, BDA, VRB, PCA (Himedia), Alginato (Êxodo científica), Goma acácia (Fibregum), amido de milho (Maizena®).

Microrganismo probiótico: cultura probiótica comercial liofilizada *Lactobacillus rhamnosus* GG (DSM 33156) contendo $5,0 \times 10^9$ UFC/g (Culturelle®). Para composição do leite foi utilizado o equipamento Ekomilk M Cap Lab, Brasil.

2.2 Procedimento experimental

O experimento foi conduzido no centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite (FEI/UEM). Foram utilizados cinco litros de leite pasteurizado procedente da fazenda Experimental Iguatemi, para fermentação dos grãos de Kefir artesanal (15g) com incubação a 25°C por 24 h. Após a fermentação, 1000 ml do produto foi concentrado por meio de tecido de algodão por 24 h sob refrigeração, logo após procedeu-se a desidratação por 5 dias em estufa com circulação de forçada de ar a 55°C (Novatécnica, modelo 5035-48, Brasil) para determinação da sua composição química (SILVA e QUEIROZ, 2002) e viabilidade microbiológica.

A acidez titulável foi calculada após 24 h de fermentação do produto *in natura* sendo retirados os grãos. Para as contagens microbiológicas pesou-se 25 g do produto desidratado em 225 ml de água peptonada tamponada e após diluições seriadas semeou-se nas placas para contagem de lactobacilos (agar MRS), contagem de coliformes totais (VRB), aeróbios mesófilos (PCA) e de bolores e leveduras (BDA) com incubação a 35°C por 48 h exceto bolores 25°C por 3 dias (produto desidratado e fermentado) (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Para encapsulação usou-se solução de alginato adicionado de goma acácia ou amido de milho. Garrafas em triplicata para cada tratamento (T1 a T6), contendo 100 ml de leite esterilizado (121°C/15 min) foram adicionadas 0,5 g de bactéria comercial liofilizada ou de Kefir fermentado.

O experimento foi em esquema fatorial, sendo 6 tratamentos e 3 períodos de avaliação. Os tratamentos foram: T1: solução de alginato a 1% + *Lactobacillus* comercial; T2: alginato 1% + 0,5 % de amido de milho+ *Lactobacillus* comercial; T3: alginato 1% + 0,5% de goma acácia + *Lactobacillus* comercial; T4: alginato a 1% + Kefir fermentado; T5: alginato 1% + 0,5% de amido de milho + Kefir fermentado; T6: alginato 1% + 0,5% de goma acácia + Kefir fermentado.

Soluções teste (100 ml) contendo 0,5 g cada microrganismo foram então extrusadas em solução de cloreto de cálcio (0,5 M). Para armazenamento a 4°C em estufa tipo BOD (SS Scientific Modelo265j, Brasil) e 100 ml de leite esterilizado foram utilizados como veículo, os quais continham 20 g de cápsulas sendo mantidos sob refrigeração por 21 dias.

A enumeração dos microrganismos tempos 7, 14 e 21 dias foi realizada de acordo com a técnica de semeadura, onde as macrocápsulas (1g) foram diluídas citrato de sódio (99 ml) mantidas a 35°C por 10 minutos e seguida realizada a diluição seriada e semeadura em placa de Petri em meio para contagem de lactobacilos (Agar MRS). As placas foram incubadas a 37°C por 48h, logo após realizou-se a contagem dos microrganismos viáveis (Silva e Landgraf, 2004). Para análise de acidez titulável 10 ml do leite contendo as cápsulas foram titulados com solução de fenolftaleína como indicador. Os dados foram analisados pelo pacote computacional SAEG (2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento médio das cápsulas após pesagem foi de 55,90% (massa/massa). O rendimento do produto seco em estufa de circulação forçada de ar foi de 30% (massa/massa) (produto desidratado). Os valores médios em percentual para a composição do leite utilizada para elaboração do Kefir foram lipídeos 3,82; sólidos totais 9,62, densidade: 34,03g/ml, ponto de congelamento 0,620°C; proteína 3,55; lactose 4,26, sais minerais 0,80 e condutividade elétrica: 5,47 ms/cm. Tais valores estavam de acordo com os preconizados pela IN 76 para composição do leite cru (BRASIL, 2018).

A acidez titulável do leite usado para fermentação foi de 16,5 °D, seguindo a IN 76 a acidez do leite deve ser entre 14 a 18 °D. Após o período de fermentação do Kefir obteve-se acidez titulável média de 26,40 °D. Os resultados das análises bromatológicas foram: 69,80% de umidade e 30,20% de matéria seca (MS) na matéria natural (MN); 0,36% de matéria mineral na MN e 3,58% na MS; 3,99% de proteína bruta na MN e 39,62% na MS e lipídeos 4,22% na MN e 41,91% na MS. GARROTE et al (2001) obtiveram os seguintes valores para Kefir: umidade 90,1%; lipídeos 0,2%; cinzas 0,7%; carboidratos 6,0% e proteínas 3,0%.

Os valores obtidos para as contagens microbiológicas para o produto após a fermentação do Kefir foram: lactobacilos $1,96 \times 10^7$; aeróbios mesófilos $1,15 \times 10^5$; bolores e leveduras $4,25 \times 10^4$ e coliformes $1,25 \times 10^2$ UFC/g. As contagens do Kefir após a desidratação foram: lactobacilos $3,13 \times 10^3$; aeróbios mesófilos $2,9 \times 10^2$; bolores e leveduras $7,0 \times 10^2$ e ausência de coliformes totais UFC/ml.

Houve diferença significativa para tratamento ($p<0,05$), sendo o tratamento contendo lactobacilos com alginato diferente estatisticamente dos demais ($6,99 \log_{10}$). Houve acidificação dos leites contendo as cápsulas (Tabela 1) evidenciando sua atividade metabólica aos 21 dias.

TABELA 1: CONTAGENS DE LACTOBACILOS E ACIDEZ TITULÁVEL DO LEITE CONTENDO BACTÉRIAS ENCAPSULADAS

Tratamentos	Log ₁₀	Graus Dornic (°D)
T1	6,99 ±0,051C	29,8 ±0,03
T2	7,68±0,220 B	25,2 ±0,11
T3	7,63±0,642 B	25,3 ±0,10
T4	7,75±0,359 B	28,4 ±0,12
T5	7,99±0,574 A	28,7 ±0,08
T6	8,08±0,238 A	28,0 ±0,14

Médias seguidas por uma letra maiúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância T1: solução de alginato a 1% + *Lactobacillus* comercial; T2: alginato 1% + 0,5 % de amido de milho+ *Lactobacillus* comercial; T3: alginato 1% + 0,5% de goma acácia + *Lactobacillus* comercial; T4: alginato a 1% + Kefir fermentado; T5: alginato 1% + 0,5% de amido de milho + Kefir fermentado; T6: alginato 1% + 0,5% de goma acácia + Kefir fermentado. Acidez titulável aos 21 dias. Coeficiente de Variação = 1,587(Contagem); Coeficiente de Variação = 6,628 (acidez)

Houve interação significativa Tratamento x Tempo ($p<0,05$). Não houve perda da viabilidade durante os 21 dias de armazenamento, embora os

tratamentos contendo goma acácia e lactobacilos (T3) e amido de milho com Kefir (T5) aos 14 dias proporcionaram as menores contagens.

WITTHUHN et al. (2004) obtiveram contagens de lactobacilos em oito amostras de grãos de Kefir com valores que variaram de 5,60 a 8,23 log UFC.ml⁻¹ e SANTOS (2008) avaliando a contagem de grupos microbianos presentes em grãos de Kefir de origens diferentes obtiveram 8,65 log UFC.ml⁻¹ para lactobacilos.

TABELA 2: CONTAGENS DE LACTOBACILOS EM LOG ₁₀ PARA CÁPSULAS REVESTIDAS COM DIFERENTES POLÍMEROS

Tempo (dias)	Tratamentos					
	1	2	3	4	5	6
7	7,06 ^{aD} ±0,02	7,88 ^{bCAB} ±0,03	7,99 ^{abcA} ±0,007	7,63 ^{cB} ±0,071	8,28 ^{abcA} ±0,007	8,17 ^{abcA} ±0,07
14	6,99 ^{cDA} ±0,03	7,49 ^{bCB} ±0,07	6,82 ^{dB} ±0,14	7,45 ^{bCB} ±0,014	7,25 ^{bcdB} ±0,02	8,09 ^{aA} ±0,07
21	6,93 ^{aD} ±0,01	7,68 ^{AB} ±0,03	8,10 ^{abcA} ±0,092	8,15 ^{abcA} ±0,31	8,43 ^{abA} ±0,007	8,00 ^{bca} ±0,07

Medias seguidas por pelo menos uma letra minúscula igual na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. Médias seguidas por pelo menos uma letra maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância T1: solução de alginato a 1% + *Lactobacillus* comercial; T2: alginato 1% + 0,5 % de amido de milho+ *Lactobacillus* comercial; T3: alginato 1% + 0,5% de goma acácia + *Lactobacillus* comercial ; T4: alginato a 1% + Kefir fermentado; T5: alginato 1% + 0,5% de amido de milho + Kefir fermentado; T6: alginato 1% + 0,5% de goma acácia + Kefir fermentado Coeficiente de Variação = 1,587

Segundo a ANVISA (2018) os limites mínimos e máximos para produtos contendo microrganismos probióticos devem ser atendidos na recomendação diária de consumo do produto para os respectivos grupos populacionais indicados pelo fabricante. Porém é recomendada a ingestão semanal mínima de 300 a 500g de produtos lácteos fermentados contendo entre 10⁶ a 10⁷ UFC.ml⁻¹ de micro-organismos probióticos. Sendo assim, todas as formulações testadas apresentaram valores mínimos de acordo a recomendação.

4. CONCLUSÃO

Os encapsulantes testados foram eficientes em manter viáveis as células bacterianas havendo manutenção da viabilidade para o Kefir e redução de apenas 1,0 log₁₀ para o produto comercial contendo lactobacilos, sendo tais valores de acordo com as quantidades mínimas preconizadas pelas recomendações diárias para efeito benéfico desejável no intestino.

VIABILITY OF ENCAPSULATED BACTERIA ON MILK

The human intestinal microbiota plays an important role in both health and disease and supplementing the diet with probiotics can ensure the balance of this microbiota. Kefir is a fermented beverage that is easy to prepare and affordable. It comes from the action of Kefir grains, which are composed of yeasts and beneficial bacteria and a polysaccharide matrix. The aim of this study was to determine the efficiency of three encapsulants in protecting two products containing bacteria: artisanal Kefir and a commercial probiotic during their 21-day shelf life. The treatments were the use of the following solutions for

encapsulation by extrusion: T1: 1% alginate for encapsulation of commercial probiotic (*Lactobacillus rhamnosus*); T2: 1% alginate + 0.5% corn starch for encapsulation of commercial probiotic; T3: 1% alginate + 0.5% acacia gum for encapsulation of commercial probiotic; T4: 1% alginate for encapsulation of fermented Kefir; T5: 1% alginate + 0.5% corn starch for encapsulation of fermented Kefir; T6: 1% alginate + 0.5% acacia gum for encapsulation of fermented Kefir. The treatment containing only alginate and the commercial probiotic had the lowest lactobacillus counts ($6.99 \log_{10}$). For titratable acidity, there was no significant difference between the treatments at 21 days of storage (27.50°D). With regard to the composition of Kefir, its protein and lipid content stands out. All the encapsulants tested were effective in keeping the microbial cells viable so that they could reach the intestine in satisfactory quantities.

REFERÊNCIAS

- BRASIL (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018. Diário Oficial da União. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. http://www.in.gov.br/materia-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076.
- DING, W.K.; SHAH, N.P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 53-61, 2009.
- FARNWORTH, E.R. Kefir: a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v.2, n. 1, p. 1–17, 2005.
- FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. 2ed. São Paulo:Ed Atheneu, 2003.
- FRITZEN-FREIRE, C.B. et al. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium BB-12* exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. LWT- **Food Science and Technology**, v.50, p.39-44, 2013.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p.365-378, 1989.
- GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Chemical and microbiological characterization of Kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 639- 652, 2001.

HAVENAAR, R.; BRINK, B.T.; VELD, J.H.I. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. **Probiotics, the scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1992. p.209-224.

JAMBHULKAR, A.B. Preparation and health benefits of Kefir: a review. **Journal of Emerging Technologies and Innovative Research**, v. 7, n. 12, p. 775-786, 2020.

KAVAS, N. et al. Determination of probiotic characteristics and resistance to biological barriers under in vitro gastrointestinal conditions in goat cheese produced using microencapsulated probiotic bacteria. **Food Science Technology**, Campinas, v. 42, e34620, 2022.

KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1457–1465, ago. 2014. doi:10.1590/0103-8478cr20120220

MELLO, H. de. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Jaboticabal, v. 33, n. 6, p. 724–730, jun. 2013. doi:10.1590/s0100-736x2013000600006

OTLES, S.; ÇAĞINDI, Ö. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, p. 54-59, 2003.

PEDROSO, D.D.L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R.J.B.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127–132, 2012.

RAJAM, R.; SUBRAMANIAN, P. Encapsulation of probiotics: past, present and future. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 11, n. 46, 2022. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00228-w>

SENSOY, I. A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. **Current Research in Food Science**. v. 4, p. 308-319, abr. 2021. doi: 10.1016/j.crcs.2021.04.004.

SMRDEL, P. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 2, p. 90-105, 2008.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SANTOS, J.P.V. **Avaliação da microbiota de grãos de Kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2008. Disponível em:

<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/7734/1/texto%20completo.pdf>.
Acesso em: 12 jun. 2023.

YADAV, R.; BHITRE, J.; ANSARI, K. Probiotic delivery systems: applications, challenges and prospective. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 4, n. 4, 2013. Doi: 10.7897/2230-8407.04401.

WITTHUHN, R.C.; CILLIERS, A.; BRITZ, T. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of Kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 125- 128, 2005.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Cadeia Produtiva do Leite (INCT-LEITE/UEL/UEM-PR), Londrina/Maringá, Paraná, Brasil (CNPq – INCT-Leite).